

Monitoring Kasus Penyakit Avian Influenza Berdasarkan Deteksi Antigen Virus Subtipe H5N1 secara Imunohistokimiawi

RINI DAMAYANTI, N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima Dewan Redaksi pada 28 Maret 2005)

ABSTRACT

DAMAYANTI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO and R.M.A ADJID. 2005. Monitoring of avian influenza cases based on the detection of viral antigen subtype H5N1 by immunohistochemical technique. *JITV* 10(4): 322-330.

Monitoring on the cases of Avian Influenza virus was conducted by detecting viral antigen subtype H5N1 using immunohistochemical technique. A total of 212 sampels of various avian tissues were collected from the Provinces of East Java (Districts of Madiun, Tulung Agung, Blitar and Kediri), West Java (Districts of Bogor, Bekasi, Cianjur and Sukabumi), Banten (Districts of Pandeglang and Tangerang) and DKI Jakarta. The sampels were collected four times i.e. June 2004, September 2004, October 2004 and between January and February 2005. All sampels were stained using immunohistochemical technique. The antigen could be visualized clearly both in the intra-nuclear and intra-cytoplasmic areas of brain, comb, wattle, trachea, lung, heart, breast and thigh muscle, proventriculus, liver, spleen, kidney, intestine and ovary. A number of 39 of 212 cases (18.4%) have been catagorized as positives. The results show that monitoring of HPAI cases conducted in June and September 2004 in the Provinces of West Java, Banten and East Java, none of the sampels were positive. However, monitoring of the disease in September 2004 in the Province of Jakarta showed that AI virus antigen were detected in various organs of chicken from Jakarta. Furthermore, monitoring of the disease conducted between October 2004 and February 2005 revealed that AI virus antigen were also detected in chicken not only from Jakarta Provinces but also from Provinces of Banten and West Java. Based on these results, it is concluded that between June and September 2004, HPAI infection were not found in areas where previous outbreaks occured in the Provinces of Banten, West Java and East Java. However, the disease was spread in Jakarta Province in September 2004 and subsequently to some districts in the Provinces of Banten and West Java. A part from this, anticipation of disease spread to currently AI-free areas should be considered as part of disease monitoring system.

Key Words: Avian Influenza, H5N1, Monitoring, Immunohistochemistry, Poultry

ABSTRAK

DAMAYANTI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan R.M.A ADJID. 2005. Monitoring kasus penyakit avian influenza berdasarkan deteksi antigen virus subtype H5N1 secara imunohistokimiawi. *JITV* 10(4): 322-330.

Monitoring kasus AI pada penelitian ini dilakukan dengan cara mendeteksi antigen virus AI subtype H5N1 secara imunohistokimiawi. Sampel berupa organ unggas yang berasal dari daerah-daerah yang pernah terjadi wabah AI dan juga daerah yang baru tertular AI. Sejumlah 212 sampel yang berasal dari Propinsi Jawa Barat (Kabupaten Bogor, Bekasi, Cianjur dan Sukabumi), Propinsi Banten (Kabupaten Tangerang), Propinsi DKI Jakarta dan Propinsi Jawa Timur (Kabupaten Madiun, Tulung Agung, Blitar dan Kediri) telah dikoleksi pada bulan Juni 2004, September 2004, Oktober 2004, dan Januari-Februari 2005. Seluruh sampel diwarnai dengan teknik imunohistokimiawi. Hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan bahwa antigen dapat dideteksi dengan jelas pada kulit pial dan jengger, otak, trakhea, jantung, paru-paru, proventrikulus, hati, limpa, ginjal dan ovarium. Antigen tersebut terdapat pada organ-organ di atas dengan lokasi dan distribusi spesifik, sebagian berkumpul atau soliter. Hasil monitoring kasus AI berdasarkan deteksi antigen secara imunohistokimiawi di Propinsi Jawa Barat, Banten, Jawa Timur dan DKI Jakarta antara bulan Juni 2004 hingga Pebruari 2005 menunjukkan bahwa dari jumlah total sebanyak 212 sampel unggas, 39 sampel (18,4%) dinyatakan positif mengandung antigen virus AI subtype H5N1. Monitoring penyakit HPAI pada bulan Juni dan September 2004 di Propinsi Jawa Barat, Banten dan Jawa Timur, pada seluruh sampel tidak terdeteksi virus AI. Sedangkan pada monitoring bulan September 2004 dari sampel yang berasal dari Propinsi DKI Jakarta dapat dideteksi virus AI. Demikian pula pada monitoring yang dilaksanakan antara bulan Oktober 2004 hingga Pebruari 2005 berhasil dideteksi antigen virus AI pada organ dari beberapa unggas yang berasal dari Propinsi Jawa Barat, Banten dan DKI Jakarta. Berdasarkan hasil pelaksanaan monitoring terhadap penyakit HPAI dapat disimpulkan bahwa sebenarnya pada bulan Juni dan September 2004 kasus AI tidak lagi ditemukan pada daerah-daerah yang pernah terjadi wabah AI pada tahun 2003 di Jawa Timur, Jawa Barat dan Banten, namun pada bulan September 2004-Februari 2005, kasus HPAI mulai menyebar ke Propinsi DKI Jakarta dan selanjutnya juga ditemukan kembali di beberapa kabupaten di Jawa Barat dan Banten. Selain itu, untuk mengantisipasi pola penyebaran penyakit, maka kewaspadaan di daerah yang sebelumnya belum pernah ditemukan kasus AI perlu ditingkatkan.

Kata Kunci: Avian Influenza, H5N1, Monitoring, Imunohistokimia, Unggas

PENDAHULUAN

Penyakit flu burung atau *Avian Influenza* (AI) atau *fowl plaque* adalah penyakit infeksius yang sangat patogenik, sangat fatal dan menular pada unggas (CIDRAP, 2004). Penyakit AI ini ada yang tergolong *Highly Pathogenic AI* (HPAI) dan *Low Pathogenic AI* (LPAI). Penyakit HPAI ini terdaftar sebagai penyakit list A pada *OIE Manual* (OIE, 2000). Penyakit ini pertama kali ditemukan di Italia pada tahun 1878.

Penyakit *Avian Influenza* (AI) disebabkan oleh virus influenza tipe A yang tergolong dalam famili *Orthomyxoviridae* dan dapat menginfeksi berbagai macam spesies antara lain: unggas, babi, kuda dan manusia (EASTERDAY dan HINSHAW, 1991). Salah satu ciri utama virus AI yaitu memiliki antigen hemaglutinin (H) dan antigen neuraminidase (N) yang terdapat pada permukaan virus. Subtipe yang menyebabkan HPAI yaitu H5 dan H7 (OIE, 2000; AUSVETPLAN, 2002). Menurut MURPHY dan WEBSTER (1996) pada influenza tipe A terdapat 15 subtipe H dan sembilan subtipe N yang selanjutnya dapat dibagi ke dalam berbagai kombinasi subtipe, misalnya H5N1, H5N2 dan lainnya. Infeksi virus ini biasanya disertai dengan gejala klinis pada saluran pernapasan, gastro-intestinal dan susunan syaraf (SWAYNE dan SUAREZ, 2000; OIE, 2000). Diduga kuat bahwa unggas yang hidup di air bertindak sebagai *reservoir* yang utama apalagi jika sistem biosekuritas tidak dilaksanakan dengan benar (SWAYNE dan SUAREZ, 2000).

Hasil penelitian *avian influenza* di Indonesia pernah dilaporkan oleh RONOARDJO (1983), RONOARDJO *et al.* (1985) dan RONOARDJO *et al.* (1986) yang berhasil mengisolasi virus LPAI dari itik, burung pelikan, bebek dan diidentifikasi sebagai virus AI subtipe H4N6 dan H4N2. Namun semenjak itu tidak lagi terdengar beritanya sampai kemudian pada bulan September–Oktober 2003 di Jawa Timur dan Jawa Barat terjadi wabah flu burung pada ayam dengan angka mortalitas mencapai 100% (DAMAYANTI *et al.*, 2004a). Wabah ini kemudian segera diikuti dengan wabah serupa di Jawa Tengah, DIY, Sumatera Barat, Lampung, Bengkulu, Bali, Kalimantan Selatan, Kalimantan Barat dan yang terbaru terjadi wabah di Sulawesi Tenggara pada bulan Maret 2005.

Metode penanggulangan wabah HPAI biasanya dilakukan dengan berbagai cara antara lain: diagnosis cepat dan akurat, pemusnahan ayam yang terinfeksi, isolasi daerah tercemar, vaksinasi dan penerapan biosekuritas yang ketat (SWAYNE dan SUAREZ, 2000). Setiap negara biasanya mempunyai kebijakan sendiri yang disesuaikan dengan kondisi setempat. Dalam hal ini, Pemerintah Indonesia telah menetapkan program vaksinasi sebagai salah satu pilihan untuk penanggulangan wabah HPAI di Indonesia. Pilihan Pemerintah Indonesia ini sesuai dengan pendapat

CAPUA dan MARANGON (2003) dan CAPUA dan MARANGON (2004) yang menyatakan bahwa apabila wabah AI terjadi pada daerah yang padat unggas terlebih lagi terdapat peternakan sambilan (*backyards farms*) sehingga biosekuritas ketat tidak dapat dilaksanakan secara benar, maka program vaksinasi merupakan pilihan utama untuk eradikasi HPAI. Pada laporan hasil pertemuan bersama OIE, FAO dan WHO di Roma pada 3-4 Februari 2004 (FAO/OIE/WHO, 2004) menyebutkan pilihan program vaksinasi ini dapat dilaksanakan dengan syarat: (1) produksi vaksin harus memenuhi persyaratan OIE; (2) program vaksinasi harus dipandang hanya sebagai alat untuk memaksimalkan pelaksanaan biosekuritas; dan (3) dalam implementasi program vaksinasi harus disertai dengan pelaksanaan surveilen. Terlebih lagi CAPUA dan MARANGON (2004) mengingatkan bahwa pelaksanaan program vaksinasi di Meksiko (wabah H5N2) dan Pakistan (wabah H7N3) dinilai tidak berhasil karena tidak disertai dengan pelaksanaan surveilen dan biosekuritas yang memadai. Oleh karena itu, untuk mengevaluasi program penanggulangan wabah AI perlu dilakukan surveilen dan monitoring secara berkala untuk mengetahui status kesehatan hewan tersebut (NAIPOSPOS, 2005).

Persyaratan ini telah diadopsi Pemerintah Indonesia, dalam hal ini Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan (WHO, 2005) pada pelaksanaan surveilen sebagai strategi pengendalian dan pemberantasan AI. Adapun kegiatan monitoring dilakukan untuk mendeteksi dinamika penyakit di lapang. Dengan demikian diharapkan dengan pelaksanaan surveilen antara lain (1) dapat dideteksi penyakit HPAI pada unggas secara dini; (2) dapat ditentukan zona bebas, terancam dan tertular; (3) dapat ditentukan subtipe virus; (4) dapat dideteksi virus HPAI pada spesies selain unggas; dan (5) dapat ditetapkan status bebas di tingkat peternakan.

Dengan mengacu pada tujuan surveilen Direktorat Kesehatan Hewan (WHO, 2005), maka tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi penyakit HPAI pada unggas secara dini dengan menggunakan teknik pewarnaan imunohistokimia dengan cara melakukan monitoring pada daerah-daerah yang pernah terjadi wabah pada tahun 2003 (DAMAYANTI *et al.*, 2004a) dan kemungkinan pada daerah yang baru tertular apabila terdapat laporan dari peternak atau Dinas Peternakan.

MATERI DAN METODE

Sampel organ ayam

Sampel organ yang dikoleksi berasal dari sejumlah peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat, saat terjadi wabah AI pada bulan September–Oktober 2003 (DAMAYANTI *et al.*, 2004a). Selain itu untuk keperluan

monitoring secara berkala terhadap kasus AI maka telah dikoleksi pula sejumlah sampel yang berasal dari berbagai lokasi di Kabupaten dan Kecamatan yang tersebar di Propinsi Jawa Timur dan Jawa Barat. Selain itu Banten dan DKI Jakarta juga dikunjungi atas permintaan Dinas Peternakan terkait (Juni 2004, September 2004 dan Januari-Februari 2005). Sejumlah peternakan telah dikunjungi, yang terdiri dari ayam petelur *breeder* dan komersial, pedaging *breeder* dan komersial, ayam buras, itik, entog, burung (perkutut, puyuh, merpati) dengan populasi dan umur bervariasi. Jika pengambilan sampel dilakukan di daerah bekas wabah tetapi pada saat tersebut sedang tidak ada kasus maka sampel dikoleksi secara acak dengan jumlah unggas yang disepakati pemilik. Apabila pengambilan sampel dilakukan pada saat ada kasus yang dicurigai terserang AI maka sampel diambil secara acak yang terdiri dari ayam sakit atau baru saja mati.

Jenis organ unggas yang dikoleksi yaitu kulit pial dan jengger, otak, trakhea, jantung, otot dada dan paha, paru-paru, proventrikulus, hati, limpa, usus, ginjal dan ovarium. Organ-organ tersebut dipotong dengan tebal sekitar 0,5 cm dan difiksasi dalam larutan formalin 10% yang sudah dibuffer selama minimal 24 jam. Organ tersebut kemudian diproses menjadi blok parafin sesuai dengan metode standar.

Sebagai kontrol positif dipakai blok parafin yang mengandung organ ayam yang diinfeksi virus AI (92/224.8) dan untuk kontrol negatif dipakai blok parafin yang tidak mengandung virus AI (94/230.17) yang merupakan organ ayam yang diinfeksi virus *Newcastle Disease* (ND). Blok-blok tersebut diperoleh dari AAHL-CSIRO, Geelong, Australia.

Antisera virus AI subtipe H5N1

Antisera terhadap virus AI subtipe H5N1 diproduksi pada kelinci untuk dipakai sebagai reagen utama pada pewarnaan imunohistokimia untuk mendeteksi antigen H5N1 pada preparat HP (DAMAYANTI *et al.*, 2004b). Serum anti virus AI subtipe H5N1 ini diproduksi pada kelinci dewasa sesuai dengan metode yang digunakan oleh YAGYU dan OHTA (1987). Isolat lokal virus AI subtipe H5N1 yang digunakan berasal dari Jawa Timur (WIYONO *et al.*, 2004; DHARMAYANTI *et al.*, 2004). Adapun prosedur detail pembuatan antisera telah dilaporkan DAMAYANTI *et al.* (2004b).

Sebagai kontrol pembanding digunakan kontrol positif antisera terhadap AI (Mab AI, ID No. 8904-26-1500) dan kontrol negatif dipakai antisera terhadap non AI (Mab NDV, ID No. Q 24-1) yang diperoleh dari laboratorium AAHL-CSIRO, Geelong, Australia.

Pewarnaan imunohistokimia dengan metode avidin biotin peroksidase

Pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh HSU *et al.* (1981), dengan menggunakan metode *avidin biotin peroxidase complex* (ABC). Dalam penelitian ini dipakai kit komersial (LSAB-2 *System peroxidase universal kit*, DAKO, No. K 0672, Denmark) (DAMAYANTI *et al.*, 2004b).

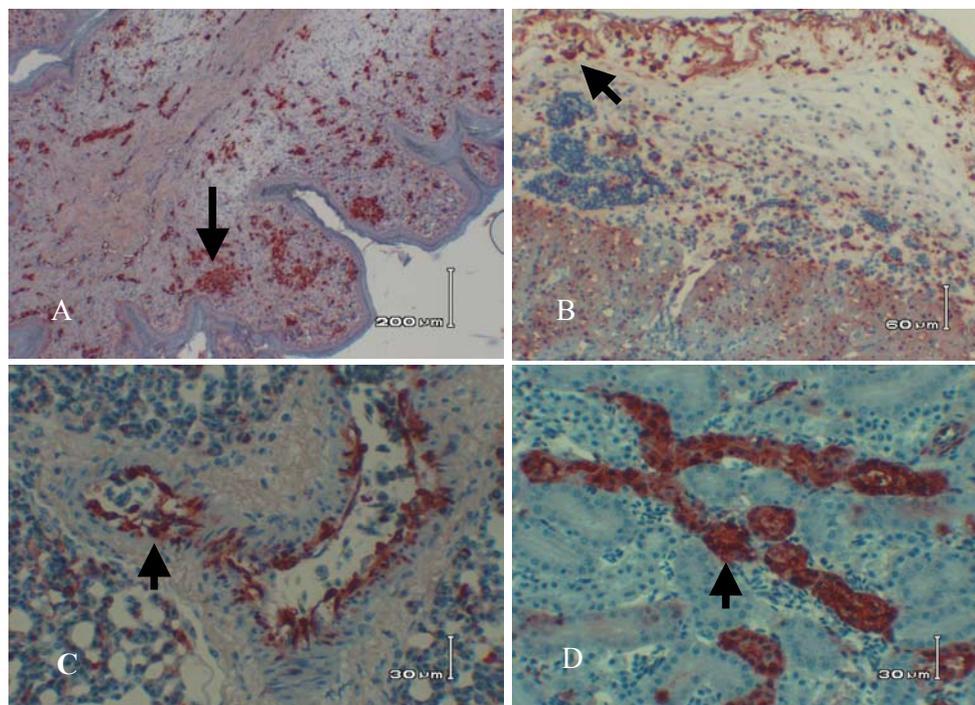
Pada prinsipnya, preparat histopatologi (HP) diaplikasikan dengan antisera terhadap virus AI subtipe H5N1 yang sudah distandarasi sebelumnya melalui *checkerboard titration*. Antisera H5N1 diaplikasikan dengan konsentrasi 1:2000 dan selanjutnya diberi antibodi sekunder yang sudah dilabel dengan biotin/*biotylated secondary antibody* (DAKO, Denmark). Setelah itu streptavidin peroksidase (DAKO, Denmark) diaplikasikan dan untuk memvisualisasikan antigen yang terdapat pada preparat HP maka ditambahkan substrat *amino ethyl carbazole* (AEC) yang berwarna coklat (Sigma Chem. Co, USA).

Pemeriksaan mikroskopis

Suatu preparat dinyatakan positif mengandung antigen virus AI apabila antigen dapat dideteksi secara definitif pada area intra-nuklear (di dalam inti sel) atau intra sitoplasmik (di dalam sitoplasma sel). Substrat yang dipakai yaitu AEC yang berwarna coklat maka antigen juga berwarna coklat, dengan latar belakang biru hematoksilin. Sebaliknya preparat dinyatakan negatif jika pada preparat tidak dapat dideteksi warna coklat pada sel definitif sehingga preparat secara difus berwarna biru saja.

HASIL

Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa antigen dapat dideteksi dengan jelas pada kulit pial dan jengger, otak, trakhea, jantung, paru-paru, proventrikulus, hati, limpa, ginjal dan ovarium. Antigen yang terdapat pada organ-organ tersebut di atas dengan lokasi dan distribusi spesifik, sebagian berkumpul atau soliter dengan latar belakang jaringan yang berwarna biru, menandakan bahwa area tersebut tidak mengandung antigen. Pada Gambar 1A terlihat antigen yang terdapat pada kulit jengger yaitu pada lapisan dermis dimana antigen tersebar secara tidak beraturan, baik secara individual maupun berkelompok dengan derajat antigen tergolong tinggi. Pada jantung antigen tersebar dalam jumlah besar, pada lapisan epikardium dan miokardium yaitu pada daerah interstitium, seperti tampak pada Gambar 1B. Gambar 1C menunjukkan antigen pada paru-paru dimana antigen ditemukan pada epitel alveoli dan juga bergerombol menutup lapisan endotel



Gambar 1. A menunjukkan antigen yang tersebar pada lapisan dermis kulit jengger (tanda panah), B menunjukkan antigen yang terdapat pada epikardium dan myokardium jantung (tanda panah), C memperlihatkan antigen yang terdapat pada dinding endotel pembuluh darah pada paru-paru (tanda panah), D menunjukkan antigen pada sekelompok sel tubulus pada ginjal (tanda panah)

pembuluh darah. Sementara itu, Gambar 1D memperlihatkan antigen yang menempati sebagian dari area sel-sel tubulus ginjal, baik di dalam inti maupun sitoplasma dengan derajat antigen tinggi dan membentuk gugusan unik. Secara umum, antigen virus AI subtipe H5N1 tersebar baik secara individual maupun berkelompok, membentuk suatu gugus atau menyerupai rantai dengan konsentrasi antigen bervariasi dari rendah sampai tinggi. Antigen tersebut menempati lokasi baik secara intranuklear maupun intrasitoplasmik pada hampir semua organ ayam yang dikoleksi sehingga seluruh bagian sel berwarna coklat kemerahan sesuai dengan warna substrat AEC yang dipakai pada metode imunohistokimia ini. Selain itu antigen virus AI subtipe H5N1 ini juga berhasil dideteksi pada daerah interstitial dan vaskular pada otak, kulit pial, trakhea, otot dada dan paha, proventrikulus, hati, limpa, usus dan ovarium.

Berdasarkan pewarnaan imunohistokimia inilah diketahui bahwa pelaksanaan monitoring penyakit HPAI pada bulan Juni 2004 di Propinsi Jawa Barat, Banten dan Jawa Timur, yakni di daerah yang pernah terjadi wabah (Tabel 1) terlihat bahwa seluruh sampel tidak terdeteksi virus AI. Demikian pula halnya monitoring yang dilaksanakan pada bulan September 2004 di daerah yang pernah terjadi wabah di Propinsi

Jawa Timur, Jawa Barat dan Banten (Tabel 2) juga tidak ditemukan sampel yang mengandung virus AI. Namun pada monitoring bulan September 2004 ini (Tabel 2), dari sampel yang berasal dari Propinsi DKI Jakarta dapat dideteksi antigen virus AI, yakni dari sejumlah 18 dari 23 sampel ayam buras dan 7 dari 20 sampel burung puyuh.

Selanjutnya pada monitoring yang dilaksanakan selama kurun waktu Oktober 2004 hingga Pebruari 2005 (Tabel 3) berhasil dideteksi antigen virus AI pada organ dari beberapa unggas yang berasal dari Propinsi Jawa Barat, Banten dan DKI Jakarta. Sampel yang positif berjumlah 14 yang berasal dari: 3 sampel ayam kampung dari Kabupaten Pandeglang, 2 sampel ayam petelur dari DKI Jakarta, 1 sampel burung perkutut dan 2 sampel ayam buras dari Kabupaten Bogor, 1 sampel ayam petelur afkir dari Kabupaten Cianjur dan 2 sampel ayam buras, 2 sampel ayam petelur dan 3 sampel ayam pedaging *breeder* dari Kabupaten Sukabumi.

Rekapitulasi hasil monitoring kasus AI berdasarkan deteksi antigen secara imunohistokimiawi di Propinsi Jawa Barat, Banten, Jawa Timur dan DKI Jakarta antara bulan Juni 2004 hingga Pebruari 2005 (Tabel 4) menunjukkan bahwa dari total 212 sampel unggas, 39 sampel (18,4%) dinyatakan positif mengandung antigen virus AI subtipe H5N1.

Tabel 1. Hasil deteksi antigen virus AI subtipe H5N1 dengan pewarnaan imunohistokimia terhadap organ ayam yang berasal dari Propinsi Banten, Jawa Barat dan Jawa Timur (Juni 2004)

Nama farm	Lokasi/ Kabupaten	Jenis unggas	Jumlah sampel ayam	Hasil
Farm 01	Tangerang	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 02	Tangerang	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 03	Tangerang	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 04	Tangerang	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 05	Tangerang	Ayam petelur	4	Negatif
Farm 06	Tangerang	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 07	Tangerang	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 08	Tangerang	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 01	Sukabumi	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 02	Sukabumi	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 03	Sukabumi	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 01	Bekasi	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 01	Bogor	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 02	Bogor	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 03	Bogor	Ayam petelur	4	Negatif
Farm 01	Kediri	Ayam Arab	2	Negatif
Farm 02	Kediri	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 03	Kediri	Ayam petelur	3	Negatif
Farm 01	Blitar	Ayam petelur	3	Negatif
Farm 02	Blitar	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 03	Blitar	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 04	Blitar	Ayam petelur	3	Negatif
Farm 05	Blitar	Itik	2	Negatif
Farm 06	Blitar	Ayam petelur	9	Negatif
Farm 07	Blitar	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 08	Blitar	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 09	Blitar	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 10	Blitar	Ayam Arab	1	Negatif
Farm 11	Blitar	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 01	Tulung Agung	Ayam petelur	3	Negatif
Farm 02	Tulung Agung	Ayam petelur	5	Negatif
	Total sampel		73	73 negatif (100%)

Tabel 2. Hasil deteksi antigen virus AI subtipe H5N1 dengan pewarnaan imunohistokimia pada organ unggas dari Propinsi Banten, Jawa Barat, DKI Jakarta dan Jawa Timur (September 2004)

Nama farm	Lokasi/ Kabupaten	Jenis unggas	Jumlah sampel	Hasil
Farm 01	Tangerang	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 02	Tangerang	Itik	3	Negatif
Farm 03	Tangerang	Itik	2	Negatif
Farm 04	Tangerang	Itik	1	Negatif
Farm 01	Bogor	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 02	Bogor	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 01	DKI Jakarta	Ayam buras	23	18 Positif
Farm 02	DKI Jakarta	Burung puyuh	20	7 Positif
Farm 01	Madiun	Burung puyuh	2	Negatif
Farm 02	Madiun	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 01	Tulung Agung	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 02	Tulung Agung	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 03	Tulung Agung	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 04	Tulung Agung	Itik	1	Negatif
Farm 01	Blitar	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 02	Blitar	Ayam buras	4	Negatif
Farm 03	Blitar	Ayam buras	2	Negatif
Farm 04	Blitar	Ayam petelur	2	Negatif
Farm 05	Blitar	Ayam petelur	6	Negatif
Farm 06	Blitar	Ayam petelur	3	Negatif
Farm 07	Blitar	Ayam Arab	1	Negatif
Farm 01	Kediri	Ayam petelur	4	Negatif
Farm 02	Kediri	Ayam petelur	1	Negatif
	Total sampel		89	25 positif (28,1%)

Apabila hasil pewarnaan imunohistokimia dibandingkan dengan pewarnaan H&E, maka terdapat enam (6) unggas yang menunjukkan hasil negatif secara imunohistokimiawi namun sebenarnya unggas tersebut secara klinis, patologi anatomis dan histopatologis mempunyai lesi yang mengarah pada lesi AI. Sampel tersebut adalah burung puyuh dan ayam buras yang berasal dari DKI Jakarta, (Tabel 2), burung merpati

yang berasal dari DKI Jakarta, (Tabel 3), entog yang berasal dari Kabupaten Bogor, (Tabel 3), ayam pedaging yang berasal dari Kabupaten Subang, (Tabel 3), dan ayam buras yang berasal dari Tangerang, (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Penelitian ini menguraikan tentang pelaksanaan monitoring penyakit HPAI di daerah-daerah yang pernah terjadi wabah pada tahun 2003 dan daerah yang baru tertular di Propinsi Banten, Jawa Barat, Jawa Timur dan DKI Jakarta yang secara keseluruhan merupakan bagian dari pelaksanaan surveilen dalam rangka penanggulangan wabah HPAI di Indonesia. Pada penelitian ini monitoring terhadap kasus AI dilakukan dengan cara mendeteksi antigen virus secara mikroskopis pada jaringan organ unggas dengan metode pewarnaan imunohistokimia (HSU *et al.*, 1981) yang telah dipakai secara luas pada beberapa penyakit unggas

(OWEN *et al.*, 1991), termasuk penyakit HPAI (BROWN *et al.*, 1992; HOOPER *et al.*, 1995; dan DAMAYANTI *et al.*, 2004b). Sehingga hal ini sesuai dengan yang disyaratkan oleh WHO bahwa dalam pelaksanaan surveilen, laboratorium harus menggunakan metode dan reagen yang diakui sesuai standar internasional (WHO, 2005).

Pada pelaksanaan monitoring ini, sampel diperoleh berdasarkan kerjasama dengan peternak, Dinas Peternakan dan laboratorium setempat. Hal ini sesuai dengan saran WHO (WHO, 2005) bahwa keberhasilan pelaksanaan surveilen hanya dapat terjadi apabila terdapat jejaring (*networking*) laboratorium diagnosis dan seluruh unsur terkait pada perusahaan unggas. Hal ini perlu mendapat perhatian bersama terutama untuk tidak mengulangi kesalahan pelaksanaan program vaksinasi yang dilaksanakan di Meksiko dan Pakistan yang tidak disertai dengan pelaksanaan surveilen dan biosekuritas memadai (CAPUA dan MARANGON, 2005).

Tabel 3. Hasil deteksi antigen virus AI subtipe H5N1 dengan pewarnaan imunohistokimia pada organ unggas dari Propinsi Banten, DKI Jakarta dan Jawa Barat (Oktober 2004-Februari 2005)

Nama farm	Lokasi/ Kabupaten	Jenis unggas	Jumlah sampel	Hasil
Farm 01	Pandeglang	Ayam kampung	3	3 Positif
Farm 01	DKI Jakarta	Burung merpati	4	Negatif
Farm 02	DKI Jakarta	Ayam petelur	2	2 Positif
Farm 01	Bogor	Burung Perkutut	1	1 Positif
Farm 01	Bogor	Entog	1	Negatif
Farm 02	Bogor	Ayam buras	2	2 Positif
Farm 01	Sukabumi	Ayam pedaging breeder	3	1 Positif
Farm 02	Sukabumi	Ayam petelur	2	2 Positif
Farm 03	Sukabumi	Ayam pedaging <i>breeder</i>	1	Negatif
Farm 04	Sukabumi	Ayam petelur	3	Negatif
Farm 05	Sukabumi	Ayam buras	1	1 Positif
Farm 06	Sukabumi	Ayam buras	1	1 Positif
Farm 07	Sukabumi	Ayam pedaging <i>breeder</i>	2	Negatif
Farm 08	Sukabumi	Ayam pedaging	6	Negatif
Farm 09	Sukabumi	Ayam pedaging	8	Negatif
Farm 01	Cianjur	Ayam petelur	1	Negatif
Farm 02	Cianjur	Ayam petelur	2	1 Positif
Farm 01	Subang	Ayam pedaging	3	Negatif
Farm 01	Tangerang	Ayam buras	4	Negatif
Total sampel			50	14 Positif (28 %)

Tabel 4. Rekapitulasi hasil deteksi antigen virus AI subtipe H5N1 di Propinsi Jawa Timur, Jawa Barat, Banten dan DKI Jakarta (September 2003-Februari 2005)

Waktu	Lokasi/ Kabupaten	Jenis unggas	Jumlah sampel	Hasil	
				Positif	Negatif
Juni 2004	Tangerang	Ayam petelur	17	0	17
Juni 2004	Bekasi	Ayam petelur	2	0	2
Juni 2004	Sukabumi	Ayam petelur	5	0	5
Juni 2004	Bogor	Ayam petelur	7	0	7
Juni 2004	Blitar	Ayam petelur, itik	27	0	27
Juni 2004	Kediri	Ayampetelur, buras	7	0	7
Juni 2004	Tulung Agung	Ayam petelur	8	0	8
Sept 2004	Tangerang	Ayam petelur, itik	8	0	8
Sept 2004	Bogor	Ayam petelur	4	0	4
Sept 2004	DKI Jakarta	Ayam buras, puyuh	43	25	18
Sept 2004	Madiun	Ayam petelur, puyuh	3	0	3
Sept 2004	Tulung Agung	Ayam petelur, itik	6	0	6
Sept 2004	Blitar	Ayam petelur, buras	20	0	20
Sept 2004	Kediri	Ayam petelur	5	0	5
Okt 2004	Pandeglang	Ayam kampung	3	3	0
Des 2004 -Jan 2005	DKI Jakarta	Burung merpati, ayam petelur	6	2	4
Jan-Peb 2005	Bogor	Burung perkutut, entog, ayam buras	4	3	1
Jan 2005	Cianjur	Ayam petelur	3	1	2
Jan-Peb 2005	Sukabumi	Ayam pedaging, petelur, buras	27	5	20
Jan 2005	Subang	Ayam pedaging	3	0	3
Peb 2005	Tangerang	Ayam buras	4	0	4
Jumlah sampel			212	39 (18,4%)	171

Monitoring terhadap kasus AI pada penelitian ini didasarkan pada deteksi antigen pada preparat organ, yakni dengan pewarnaan imunohistokimia (IHK). Dibandingkan dengan pewarnaan IHK, pewarnaan konvensional hematoxilin dan eosin (H&E) lebih mudah, cepat, dan dapat menggambarkan jenis dan distribusi lesi, namun pewarnaan ini tidak dapat mendeteksi antigen virus karena ukurannya yang sangat kecil. Selain itu, apabila semua reagen tersedia maka teknik pewarnaan imunohistokimia ini hanya memerlukan waktu 5 jam untuk mendeteksi antigen pada jaringan organ unggas. Sehingga pewarnaan IHK ini dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis HPAI, sambil menunggu hasil isolasi dan identifikasi virus yang memerlukan beberapa hari pengujian dan pemeriksaan. Bahkan, reaksi warna yang terjadi pada metode IHK ini tergolong cukup permanen sehingga tidak perlu dilihat dengan mikroskop fluoresens (MOMOTANI, 1994). Selain visualisasi antigen, jaringan organ yang terinfeksi dan derajat keparahan lesi dapat

terlihat dengan jelas (DAMAYANTI dan DARMINTO, 2001; DAMAYANTI *et al.*, 2004b).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sesungguhnya pewarnaan IHK memiliki kelebihan dibandingkan dengan pewarnaan H&E (MOMOTANI, 1994), namun pewarnaan ini juga menuntut kualitas yang tinggi untuk reagen yang digunakan, yakni dimulai pada saat pengambilan sampel hingga saat pengujian. Hal ini terlihat pada hasil beberapa sampel yang secara klinis, patologi anatomis dan histopatologis mempunyai lesi yang sangat mengarah pada lesi AI namun menunjukkan hasil yang negatif secara imunohistokimiawi. Kemungkinan besar hasil deteksi antigen virus pada organ unggas tersebut di atas merupakan hasil *false negative* karena sampel organ berasal dari bangkai unggas yang sudah mengalami autolisis, yang berdampak pada kerusakan komponen protein virus AI sehingga antigen tidak dapat dideteksi dengan teknik IHK.

Monitoring yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa di daerah yang pernah terjadi wabah pada tahun 2003 di Propinsi Banten, Jawa Barat dan Jawa Timur, ternyata pada pelaksanaan monitoring bulan Juni 2004 (Tabel 1) dan September 2004 (Tabel 2) tidak satu pun sampel yang positif secara imunohistokimia. Padahal hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa di daerah-daerah tersebut pada tahun 2003 semua sampel (100%) yang dikoleksi secara imunohistokimiawi dinyatakan positif (DAMAYANTI *et al.*, 2004b). Kemungkinan besar pada saat itu semua peternakan di daerah-daerah tersebut setelah wabah pertama tahun 2003 telah menerapkan sistem biosekuritas yang ketat dan melaksanakan program vaksinasi secara disiplin sesuai anjuran pemerintah.

Pada saat yang bersamaan (September 2004), ternyata justru Propinsi DKI Jakarta yang pada tahun 2003 bebas dari wabah HPAI ternyata pada pelaksanaan monitoring bulan September 2004 (Tabel 2) ini ditemukan sejumlah ayam buras dan burung puyuh terserang AI. Hal ini kemungkinan disebabkan karena unggas di daerah tersebut belum pernah diberi vaksin AI sehingga sangat potensial untuk terserang AI. Hasil ini juga menunjukkan bahwa ayam buras perlu mendapat perhatian dalam rangka eradikasi kasus HPAI, bukan hanya karena nilai ekonomisnya melainkan juga kemungkinan peran ayam buras dalam penyebaran penyakit pada peternakan ayam komersial di sekitarnya. Selain itu, hasil ini menunjukkan bahwa burung puyuh pun merupakan hewan yang peka terhadap virus HPAI sebagaimana pernah dilaporkan oleh PEREZ *et al.* (2003). Hal ini membuktikan bahwa secara penularan buatan burung puyuh lebih sensitif daripada ayam yang diinfeksi isolat AI asal bebek.

Hasil pelaksanaan monitoring selanjutnya di Propinsi Jawa Barat, Banten dan DKI Jakarta pada kurun waktu bulan Oktober 2004 hingga Pebruari 2005 menegaskan bahwa bulan September 2004 dan awal tahun 2005 kasus AI kembali merebak di Jawa Barat. Lebih lanjut jenis unggas yang terserang lebih beragam, antara lain burung puyuh, ayam buras, burung merpati, entok, dan ayam pedaging. Apabila program vaksinasi sudah dicanangkan maka sebaiknya unggas yang memiliki nilai tinggi terutama unggas yang peka terhadap HPAI yang berada di kebun binatang dan tempat penangkaran juga harus divaksinasi. Beberapa masalah yang dapat mempersulit pengendalian AI yaitu adanya unggas liar yang luput dari program vaksinasi, misalnya ayam kampung, itik tegalan, unggas di pasar burung dan ayam aduan serta peran unggas air sebagai *reservoir* (TRACEY *et al.*, 2004 dan NAIPOSPOS, 2005).

Hasil monitoring terhadap virus influenza pada unggas ini merupakan tahap awal yang sangat penting artinya untuk mengetahui kemungkinan terjadinya penyebaran pada unggas lain maupun penularan pada manusia (CLAAS, 2005) sebagaimana hal ini pernah

dilaporkan pada wabah HPAI yang disebabkan oleh subtype H5N1 pada unggas dan manusia di Hongkong (GUAN *et al.*, 1999).

KESIMPULAN

Hasil pelaksanaan monitoring terhadap penyakit HPAI menunjukkan bahwa pada bulan Juni dan September 2004 kasus AI tidak lagi ditemukan pada daerah-daerah yang pernah terjadi wabah AI pada tahun 2003 di Jawa Timur, Jawa Barat dan Banten. Pada bulan September 2004, kasus HPAI mulai menyebar ke Propinsi DKI Jakarta. Mulai Oktober 2004 hingga Maret 2005 kasus HPAI muncul kembali di beberapa kabupaten di Jawa Barat dan Banten

Mengingat kemungkinan penyebaran penyakit semakin meluas, maka kewaspadaan harus ditingkatkan pada daerah yang sebelumnya belum pernah ada kasus AI.

DAFTAR PUSTAKA

- FAO/OIE/WHO. 2004. Technical Consultation on the Control of Avian Influenza. Roma 3-4 Februari 2004.
- NAIPOSPOS, T.S.P. 2005. Surveilen sebagai salah satu strategi pengendalian dan pemberantasan *avian influenza*. Disampaikan pada Rakor Teknis Nasional Bidang Kesehatan Hewan. Puslitbang Peternakan, Bogor, 14 Mei 2005.
- WHO. 2005b. Surveillance for influenza. <http://www.who.int/emc-documents/influenza/docs/animalinfluenza/HTML/surveillance.htm>. [30 Maret 2005].
- AUSVETPLAN. 2002. Disease strategy: highly pathogenic avian influenza. www.aahc.com.au/ausvetplan/hpai. [5 Agustus 2003].
- BROWN, C.C., H.J. OLANDER and D.A. SENNE. 1992. A pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus H5N2 in chickens, using immunohistochemistry. *J. Comp. Path.* 107: 341-348.
- CAPUA, I. and S. MARANGON. 2003. The use of vaccination as an option for the control of avian influenza. *Avian Patholog.* 32: 335-343.
- CAPUA, I. and S. MARANGON. 2004. Vaccination for avian influenza in Asia. *Vaccine* 22: 4137-4138.
- Center for Infectious Disease Research & Policy (CIDRAP). 2004. Highly Pathogenic Avian Influenza (Fowl Plaque). Academic Health Center, University of Minnesota. p. 14.
- CLAAS, E.C.J. 2005. The importance of animal influenza surveillance. [h.org/The importance of animal influenza surveillance.cfm](http://h.org/The%20importance%20of%20animal%20influenza%20surveillance.cfm) [22 Mei 2005].
- DAMAYANTI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2004b. Deteksi virus *avian*

- influenza* subtipe H5N1 pada organ ayam yang terserang flu burung sangat patogenik di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan teknik imunohistokimia. *JITV* 9: 197-203
- DAMAYANTI, R, N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004a. Gambaran klinis dan patologis pada ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV* 9: 128-135.
- DAMAYANTI, R. dan DARMINTO. 2001. Deteksi antigen virus infectious bronchitis dengan teknik imunohistokimiawi pada ayam pedaging yang diinfeksi dengan isolat IB-269 atau disuntik dengan vaksin hidup H-120. *JITV* 6: 239-246.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2004. Identifikasi virus *avian influenza* isolat lokal Indonesia dengan *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). *JITV* 9: 136-142.
- EASTERDAY, B.C. and V.S. HINSHAW. 1991. Avian Influenza. In: Disease of Poultry 9th Ed. B.W. CALNEK, H.J. BARNES, C.W. BEARD, W.M. REID and H.W. YODER (Jr) (Eds). Iowa State University Press, Ames. pp. 532-551.
- GUAN, Y., K.F. SHORTRIDGE, S. KRAUSS and R.G. WEBSTER. 1999. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9363-9367.
- HOOPER, P.T., G.W. RUSSELL, P.W. SELLECK and W.L. STANISLAWEK. 1995. Observation on the relationship in chickens between the virulence of some *avian influenza* viruses and their pathogenicity for various organs. *Avian Dis.* 39: 458-464.
- HSU, S.M., L. RAINE and H. FANGER. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol.* 75: 816-821.
- MOMOTANI, E. 1994. Principles of immunohistochemistry techniques and their application. National Institute of Animal Health Biodefence Research Division, Laboratory of immunopathology. Tsukuba, Japan. pp. 1-21.
- MURPHY, B.R. and R.G. WEBSTER. 1996. Orthomyxoviruses. In: *Fields Virology* 3rd ed. B.N. FIELDS, D.M. KNIPE and P.M. HOWLEY (Eds). Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia. pp. 1397-1445.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). 2000. Highly Pathogenic Avian influenza. Manual of standard diagnostic tests and vaccine. www.oie.int. pp. 1-16 [28 Agustus 2003].
- OWEN, R.L., B.S. COWEN, A.L. HATTEL, S.A. NAQL and R.A. WILSON. 1991. Detection of viral antigen following exposure of one day old chicken to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 20: 663-673.
- PEREZ, D.R., W. LIM, J. P. SEILER, G. YI, M. PEIRIS, K.F. SHORTRIDGE and R.G. WEBSTER. 2003. Role of quail in the interspecies transmission of h9 influenza a viruses: Molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens. *J. Virol.* 77: 3148-3156.
- RONOHARDJO P., S. PARTOUTOMO, S. HASTIONO, N. GINTING and S. POERNOMO. 1986. The Status of duck diseases in Indonesia. *Penyakit Hewan XVIII* (31). Semester I Th 1986. pp. 86-93.
- RONOHARDJO, P. 1983. Penyakit Cengesan atau selesma pada itik Tegal, Bali dan Alabio. *Penyakit Hewan* 15(25): 61-71.
- RONOHARDJO, P., S. HARDJOSWORO, S. PARTOATMOJO and M. PARTADIREDJA. 1985. The Identification and Distribution of Influenza A virus in Indonesia. *Penyakit Hewan XVII* (29), Semester I: 249-257.
- SWAYNE, D.E. and D.L. SUAREZ. 2000. Highly pathogenic avian influenza *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 19(2): 463-482
- TRACEY, J.P., R. WOODS, D. ROSHIER, P. WEST and G.R. SAUNDERS. 2004. The role of wild birds in the transmission of avian influenza for Australia: an ecological perspective. *Emu* 104:109-124
- WIYONO, A, NLP. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, R. DAMAYANTI dan DARMINTO. 2004. Isolasi dan identifikasi virus *avian influenza* tipe A, subtipe H5N1. *JITV* 9: 61-71
- YAGYU, K. and S. OHTA. 1987. Enzyme-linked immuno sorbent assay for the detection of infectious bronchitis virus antigen. *Japanese J. Vet. Sci.* 49: 757-763